

Abstract

Synovial joints, consisting of femur, tibia and connective tissues like tendon and ligaments, connect long bones and support body movement. Collagen IX and collagen XII are the two major members of Fibril associated collagens with interrupted triple helix (FACIT) family. They decorate into fibril collagens to maintain its integrity. Yet the molecular functions of FACIT proteins still remain unknown and need to be further elucidated. This doctoral study is focusing on characterizing the novel roles of collagen IX and collagen XII in joint development and metabolism *in vivo* using transgenic mice.

Fluorescent *in situ* hybridization by amplified branched DNA technology was established to define the expression pattern in neonatal murine joint. Combination of fluorescent *in situ* hybridization and immunofluorescence staining reveals spatiotemporal expression pattern of *Col12a1* mRNA and collagen XII protein in tendon and ligaments of synovial joints. Loss of collagen XII in ECM of musculoskeletal system leads to patella instability and quadriceps muscle weakness in both genetic knockout mice model and human patients with mutations in COL12A1 gene. These phenotypes are further found to be associated with deformed trochlear grooves and changes in tendon elasticity. High resolution single cell RNA sequencing technique revealed that collagen XII deficiency induces a cellular stress response and downregulation of ECM genes in tenocytes. *In vitro* siRNA knockdown of *Col12a1* in MC3T3 cell line leads to less lipid formation, while *in vivo* *Col12a1* knockout mice also showed less BMI compared to their wildtype littermates at the condition of same amount of daily food intake. Compared to the wide expression pattern of collagen XII, collagen IX showed strict expression pattern in cartilage ECM. Depletion of collagen IX expression is found to result in a hypercellular area with reduced cell number and matrix protein expression in cartilage during endochondral ossification. *Col9a1* knockout mice also showed shorter long bones, which may due to the delayed secondary ossification center formation. Analysis of single cell RNA sequencing data in collagen IX deficient chondrocytes discloses a set of downregulated genes involved in mevalonate pathway and fatty acid elongation, which implies its novel functions in regulating and maintaining lipid and cholesterol synthesis.

In summary this study unveils the importance roles of FACIT proteins in musculoskeletal system development and cell metabolism. Collagen XII and collagen IX is not only important in maintaining ECM integrity and stiffness but also in tissue homeostasis by regulating cell differentiation and metabolism.

Zusammenfassung

Das Kniegelenk (lat. *Articulatio genus*) ist ein Synovialgelenk, bestehend aus dem Oberschenkelknochen (lat. *Femur*), dem Schienbein (lat. *Tibia*) und der Kniescheibe (lat. *Patella*). Zusammen mit Bindegewebe in Form von Sehnen und Bändern verbindet es die Röhrenknochen des Beins und ermöglicht dessen Bewegung. Kollagen IX und Kollagen XII sind die beiden wichtigsten Mitglieder der Familie der fibrillenassoziierten Kollagene mit unterbrochener Tripelhelix (FACIT). Sie lagern sich in die Kollagenfibrillen ein, um deren strukturelle Integrität zu erhalten. Die molekularen Funktionen der FACIT-Proteine sind jedoch noch immer unbekannt und müssen weiter aufgeklärt werden. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Charakterisierung der neuen Rollen von Kollagen IX und Kollagen XII in der Gelenkentwicklung und im Stoffwechsel *in vivo* unter Verwendung transgener Mäusen.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mittels amplifizierter verzweigter DNA wurde genutzt, um das Expressionsmuster in Gelenken neugeborener Mäuse zu bestimmen. Die Kombination von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Immunfluoreszenzfärbung zeigt das räumlich-zeitliche Expressionsmuster von *Coll2a1* mRNA und Kollagen XII-Protein in Sehnen und Bändern von Synovialgelenken. Der Verlust von Kollagen XII in der ECM des Bewegungsapparats führt sowohl bei genetischen Knockout-Mäusen als auch bei menschlichen Patienten mit Mutationen im COL12A1-Gen zu einer Instabilität der Patella und einer Schwäche des Musculus quadriceps femoris. Diese Phänotypen werden außerdem mit deformierten Gleitlagern der Patella und Veränderungen der Sehnenelastizität in Verbindung gebracht. Hochauflösende Einzelzell-RNA-Sequenzierungstechniken zeigten, dass ein Mangel an Kollagen XII eine zelluläre Stressreaktion und eine Herunterregulierung von ECM-Genen in Tenozyten auslöst. *In vitro* führt der siRNA-Knockdown von *Coll2a1* in der MC3T3-Zelllinie zu einer geringeren Lipidbildung, während *in vivo* *Coll2a1*-Knockout-Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern bei gleicher täglicher Nahrungsaufnahme auch einen geringeren BMI aufweisen. Verglichen mit dem breiten Expressionsmuster von Kollagen XII zeigte Kollagen IX ein engeres Expressionsmuster in der Knorpel-ECM. Die Deletion der Kollagen IX-Expression führt zu einem hyperzellulären Bereich mit reduzierter Zellzahl und Matrixprotein-Expression im Knorpel während der chondralen Ossifikation. *Col9a1*-Knockout-Mäuse wiesen auch kürzere Röhrenknochen auf, was

möglicherweise auf die verzögerte Bildung sekundärer Knochenkerne zurückzuführen ist. Die Analyse von Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten in Chondrozyten mit Kollagen-IX-Mangel offenbart eine Reihe von herunterregulierten Genen, die am Mevalonatweg und an der Fettsäureelongation beteiligt sind, was auf neuartige Funktionen bei der Regulierung und Aufrechterhaltung der Lipid- und Cholesterinsynthese schließen lässt.

Zusammenfassend enthüllt diese Arbeit die wichtige Rolle der FACIT-Proteine bei der Entwicklung des muskuloskelettalen Systems und des Zellstoffwechsels. Kollagen XII und Kollagen IX sind nicht nur wichtig für die Aufrechterhaltung der Integrität und Steifigkeit der ECM, sondern auch für die Homöostase des Gewebes, indem sie die Zelldifferenzierung und den Stoffwechsel regulieren.